

再生不良性貧血患者における骨髓T細胞クロノタイプの解析

金沢大学医学部医学科内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

高 松 秀 行

再生不良性貧血 (aplastic anemia, AA) の発症機序は多種多様であるが、そのなかでも免疫学的な機序による造血の抑制は最も重要なものと考えられてきた。近年、種々の臓器特異的自己免疫疾患において、限られたT細胞レセプター (T cell receptor, TCR) を有するT細胞クローンが標的臓器に浸潤していることが明らかになった。免疫学的な抑制機序が発症に関与しているAA患者の骨髓においても、一部のT細胞が抗原特異的にクローン性に増殖している可能性がある。そこで、免疫機序の関与が濃厚な症例を中心にAA患者の骨髓について、T細胞のクローン性増殖の有無を検討した。対象としたのは、造血能がシクロスポリン (cyclosporine, CyA) に依存性に回復する (CyA 依存性) 輸血歴のないAA患者1例 (患者I)、輸血歴のないCyA非依存性のAA患者2例 (患者II: CyA有効, 患者III: CyA無効)、輸血歴を有するCyA依存性のAA患者1例 (患者IV)、健常人6例である。患者骨髓よりT細胞を分離し、mRNAを鋳型としてcDNAを作成後、TCR β 鎖のV領域 (V β) の各ファミリー22種類に特異的なプライマーとC領域に相当するプライマーを用いて、PCRにより各TCR β cDNAを増幅した。得られたPCR産物について、一本鎖DNA高次構造多型 (single strand conformation polymorphism, SSCP) 法の原理を利用することにより、クローン性に増殖しているT細胞の有無と、そのT細胞クローンのTCR β 鎖V領域 (T cell receptor V β , TCRV β) の多型性 (クロノタイプ) を決定した。健常人6例およびCyA非依存性AAの患者IIでは、22種類のTCRV β 増幅産物はすべてスメアを呈し、特定のT細胞の単クローン性の増殖を示す明らかなバンドは見られなかった。輸血歴があるCyA依存性AAの患者IVでは、ほとんどすべてのTCRV β 増幅産物中に複数のバンドが検出された。これは、輸血に伴う同種抗原刺激の影響と考えられた。一方、輸血歴のないCyA依存性AAの患者Iと、CyAが無効であったAAの患者IIIではいくつかのTCRV β ファミリーに明瞭なバンドが検出された。とくにCyA依存性の患者Iでは、V β 15⁺のバンドが顕著であった。このV β 15⁺T細胞の相補性決定部3 (complementarity determining region 3, CDR3) 領域の塩基配列は、骨髓T細胞を自己のCD34⁺細胞に富む分画と共に培養後、限界希釈法によって得られたCD4⁺T細胞クローンの一つの塩基配列と一致していた。以上の所見から、免疫学的な造血抑制機序が発症に関与しているAA患者の骨髓では、造血前駆細胞上の何らかの抗原に反応して単クローン性に増殖するCD4⁺T細胞が存在していることが示唆された。

Key words aplastic anemia, cyclosporine, T cell receptor, clonotype, single strand conformation polymorphism

再生不良性貧血 (aplastic anemia, AA) は、汎血球減少と骨髓低形成を主徴とする一つの症候群である。このため、発症機序は単一ではなく多種多様である。そのなかでも免疫学的な機序による造血の抑制は最も重要なものと考えられてきた。これは、AA患者の約半数が抗胸腺細胞グロブリン (antithymocyte globulin, ATG)、抗リンパ球グロブリン (antilymphocyte globulin, ALG)、シクロスポリン (cyclosporine, CyA) などの免疫抑制療法に反応して改善するという臨床的観察に基づいている¹⁰⁾。しかし、ATGやALGには、免疫抑制作用だけではなく造血を刺激する効果もあることが知られている。このため、ATG療法を受けたAA患者が改善したとしても、それらのすべてに免疫学的な機序が関与していたとはいえない⁹⁾。一方、CyAの場合、作用はT細胞からのサイトカイン分泌の抑制に

限られている⁹⁾。このため、免疫抑制療法後に改善したAA患者の中でも、ATGが奏効した症例より、CyA単独療法に反応した症例の方が、免疫学的機序の関与がより濃厚と考えられる。

CyAが奏効した一部のAA患者は、CyA中止後再発をきたし、再開により再び寛解となる。このようなCyA依存性のAA患者では、治療前の骨髓単核細胞にインターフェロン γ 遺伝子の発現が高率に検出される⁹⁾。また、CyA依存性AA患者の大部分は、ヒト主要組織適合抗原 (human leukocyte antigen, HLA) のクラスIIのハプロタイプのうちDRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602を保有していることが示されている⁹⁾。これらの所見から、CyA依存性のAA患者の骨髓では、何らかの免疫反応が存在することがうかがえる。

平成8年9月13日受付, 平成8年10月24日受理

Abbreviations: AA, aplastic anemia; ALG, antilymphocyte globulin; ATG, antithymocyte globulin; BMNC, bone marrow mononuclear cells; CDR3, complementarity determining region 3; CyA, cyclosporine; DEPC, diethyl pyrocarbonate; HLA, human leukocyte antigen; mAb, monoclonal antibody; MMLV RT

T細胞は、T細胞レセプター (T cell receptor, TCR) によって抗原と HLA との結合物を認識している。TCR は、 α 鎖、 β 鎖、あるいは、 γ 鎖、 δ 鎖のヘテロダイマーと CD3 分子から構成される。ヒト β 鎖遺伝子は第7番染色体 q32-35 に位置し、約60個のV領域、2個のD領域、13個のJ領域、そして2個のC領域遺伝子から構成されている。TCR の β 鎖の多型性は、V-D-J の再構成と各々の接合部、N領域にヌクレオチドが挿入されることにより、 10^{15} 以上の多型性が存在する⁷⁾。一部の自己免疫疾患の標的臓器では、限られた TCRV β を持つT細胞が選択的に増加していることが示されている⁸⁻¹⁰⁾。また、このようなT細胞を詳細に検討した最近の報告では、ある V β ファミリー陽性のT細胞が全体として増えているのではなく、一部のT細胞が抗原に対応してクローン性に増殖していることが示された¹¹⁻¹⁶⁾。このようなクローン性に増えているT細胞の種分け(クロナタイプの決定)は、対応する抗原を推測する上で有力な手段になりつつある。免疫学的抑制機序が発症に関与しているAA患者の骨髄においても、一部のT細胞が抗原特異的にクローン性に増殖している可能性がある。そこで、CyA 依存性患者を中心として、AA患者の骨髄についてT細胞のクロナタイプを検討した。

対象および方法

I. 対 象

金沢大学医学部附属病院で治療されたAA患者4例、および健康人6例を対象とした。これらの患者の特徴を表1に示す。うちわけは、輸血歴のないCyA依存性のAA患者1例(患者I, 表1, Patient 1), 輸血歴のないCyA非依存性のAA患者2例(患者II, 表1, Patient 2: CyA有効, 患者III, 表1, Patient 3: CyA無効), 輸血歴を有するCyA依存性のAA患者1例(患者IV, 表1, Patient 4)であった。これらの患者の特徴を表1に示す。輸血歴のないCyA依存性のAAの患者Iの経過を図1に示す。

II. 骨髄 T 細胞の分離

患者から同意を得た後、CyA療法前の患者、および正常人よ

りヘパリン加骨髄血を採取した。この骨髄血をリンフォブレップ (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway) に重層後 2000 rpm で15分遠心し、中間層を回収することにより骨髄単核球 (bone marrow mononuclear cells, BMMC) を分離した。このBMMCから、2アミノエチルイソチオウロニウムブロマイド (2-aminoethyl isothiuronium bromide) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) で処理したヒツジ赤血球とのロゼット形成法によりT細胞を分離した。

III. RNA の抽出

分離したT細胞 1×10^6 個にフェノールとチオシアン酸グアニジンを含む均一な液体 (ISOGEN, ニッポンジーン, 富山) 1ml を加えて細胞を融解した。0.2ml のクロロホルムを加え攪拌後、3分間室温に放置した。次に4℃, 12000rpm で15分間遠心し上層部を採取した。これにイソプロパノール 0.5ml 加え5分間室温に放置し、RNA を析出させた。12000rpm で15分遠心後、沈殿したRNAを回収し70%冷エタノールで洗浄後、0.1% 二炭酸ジエチル (diethyl pyrocarbonate, DEPC, Sigma Chemical Co.) で処理した精製水に溶解した。吸光度計を用いてRNA回収量を測定した。

IV. TCR 解析を用いた T 細胞クロナタイプの検討

1. 原 理

個々のT細胞に特異的なクロナタイプはTCRの相補性決定部3 (complementarity determining region 3, CDR3) 領域、すなわちD領域とその前後のN領域およびJ領域のアミノ酸配列により決定されている⁷⁾。このCDR3領域は、TCRと抗原の結合に重要な役割を果たしている¹⁷⁾。リンパ球集団からmRNAを鋳型として、cDNAを作成し、V領域の各ファミリー22種類に特異的なプライマーとC領域に相当するプライマーを用いてPCRを行うと、各TCRV β に特異的なPCR産物が得られる。これらは各TCRV β ごとに似かよった長さを示すが、実際には中間に存在するCDR3領域の塩基配列の多様性のため、約 10^{15} 種類もの異なる塩基配列を呈する⁷⁾。あるT細胞集団内で特定のT細胞がクローン性に増殖していることを証明するためには、増幅されたcDNA断片をベクターと大腸菌を用いてサブ

Table 1. Characteristics of CyA-treated patients

Patient	Age (year)	Sex	Diagnosis	Hematologic data before CyA therapy		
				Absolute neutrophil count (/μL)	Reticulocyte count (×10 ⁴ /μL)	Platelet count (×10 ³ /μL)
Responder*						
1	63	M	MAA	1060	4.7	17.0
2	60	F	MAA	900	6.1	10.0
4	24	M	SAA	480	2.3	12.0
Non-responder						
3	26	M	MAA	450	3.5	20.0

F, female; M, male; CyA, cyclosporine; MAA, moderate aplastic anemia; SAA, severe aplastic anemia; *Criteria of response include a resolution of all transfusion requirement and a rise in the hemoglobin level of 2g/dL or more without transfusions.

RNase⁻, Moloney Murine Leukemia Virus-derived reverse transcriptase without RNase H activity; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PHA, phytohemagglutinin; SSCP, single strand conformation polymorphism; TCR, T cell receptor; TCRV β , T cell receptor V β

クローニングをし、無作為に抽出した cDNA クローン中に同一のクローンが多数を占めることを CDR3 領域のシーケンシングにより示す必要がある。近年 Yamamoto ら¹⁰⁾は、突然変異を検出するために Orita ら¹⁰⁾が開発した一本鎖 DNA 高次構造多型 (single strand conformation polymorphism, SSCP) 法を用いて、クローン性に増殖している少数の T 細胞の存在を明らかにする簡便な方法を報告した。彼らの方法を改変した解析の流れを図 2 に示した。

2. cDNA の合成

1 μ g の RNA を 11 μ l の DEPC 処理蒸留水に溶解し、65°C で 10 分間変性させた後、20 ng のオリゴ (dT) 12-18 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を加えてアニーリングさせた。冷却後、200 単位のモロニー鼠白血病ウイルス由来の逆転写酵素 (Moloney Murine Leukemia Virus-derived reverse transcriptase without RNase H activity, MMLV RT RNase H⁻, Superscript, Gibco-BRL, Eggenstein, Germany) と 4 種類のデオキシ三リン酸 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega, Wisconsin, USA) 各 20 nmol, および MMLV RT RNase H⁻ に添付されたバッファーを加えて 20 μ l とし、45°C で 1 時間反応させることにより cDNA を合成した。

3. cDNA の PCR による増幅

CDR3 領域を含む TCRV β の cDNA 断片を Choi ら²⁰⁾の方法に従い、PCR で増幅した。5' 側のプライマーは 22 種類の V β 特異的なプライマーを用い、3' 側のプライマーには C β 領域に相補的なプライマーを用いた。プライマーの塩基配列を表 2 に示す。各々のプライマーの最終濃度は 0.3 μ M に調節した。22 分の

1 の cDNA に 2 単位の Taq ポリメラーゼ (amplitaq polymerase, Perkin-Elmer, Emeryville, California, USA) と、4 種類のデオキシ三リン酸 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega) 各 200 μ M を加え、Cetus/Perkin-Elmer 社製 (Norwalk, USA) のサーマルサイクラーを用いて PCR を行った。PCR の反応条件は、95°C での熱変性を 1 分、55°C でのアニーリングを 1 分、72°C での伸長反応を 1 分とし、サイクル数は 35 サイクルとした。

4. SSCP 法による PCR 増幅産物の解析

一本鎖の DNA はその塩基配列に従って独自の立体構造をとるため、同じ長さの DNA 断片であっても、一塩基でも異なるものがあれば非変性ゲルで電気泳動すると異なる泳動度を示す。PCR 増幅産物をこの SSCP 法の原理を利用して解析した。

6 μ l の PCR 産物にホルムアミド溶液 (80% ホルムアミド, 20 mM EDTA, 0.1% プロピフェノールブルー, pH 8.0) を最終濃度が 50% になるように加えた後、96°C で 5 分間インキュベートした。氷上で急速に冷却した検体を 8% ポリアクリルアミドゲルを用いて、13 V/cm で 3 時間電気泳動した。泳動終了後のゲルを銀染色試薬 (第一化学, 東京) を用いて染色することにより DNA を検出した。検体のリンパ球集団が多クローン性の場合には、各 T 細胞の CDR3 領域の塩基配列は千差万別であるため、各 cDNA 断片のバンドは連続的に分布し、その結果スメアを呈する。検体がモノクローナル T 細胞集団の場合には、特定の V β cDNA 増幅産物の泳動レーンに、センスおよびアンチセンスの二組のバンドが検出される。もし、一つの T 細胞ク

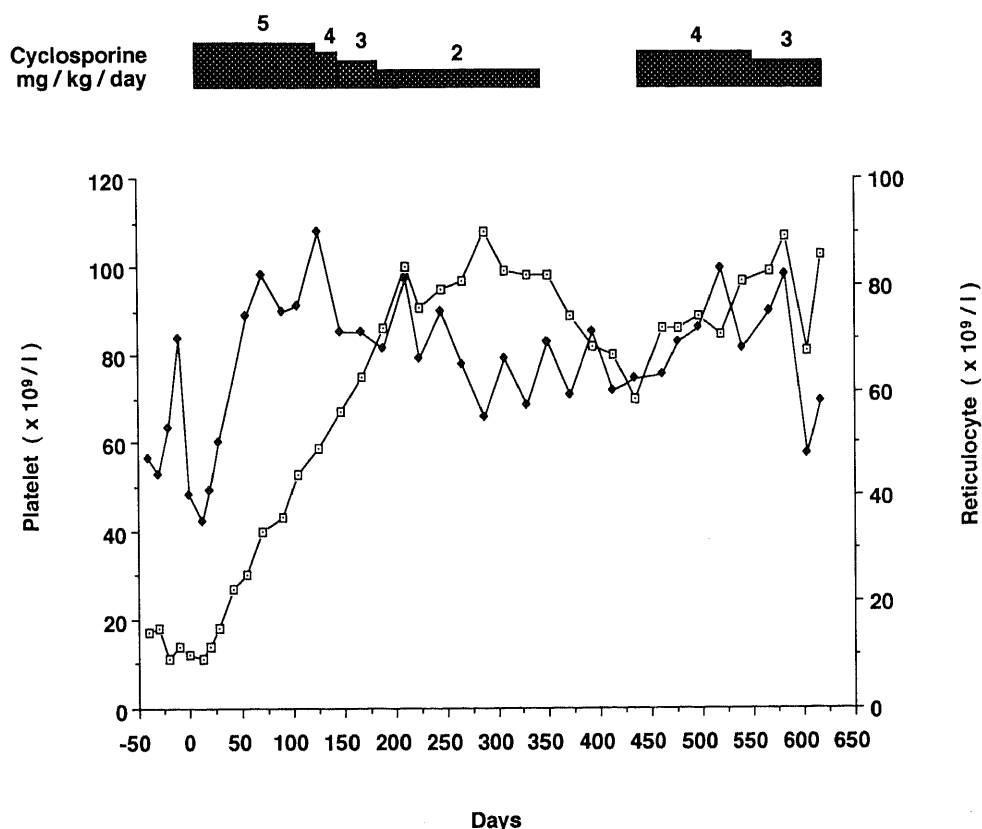


Fig. 1. Changes in blood cell counts in Patient 1 after cyclosporine therapy. \square , platelet; \blacklozenge , reticulocyte.

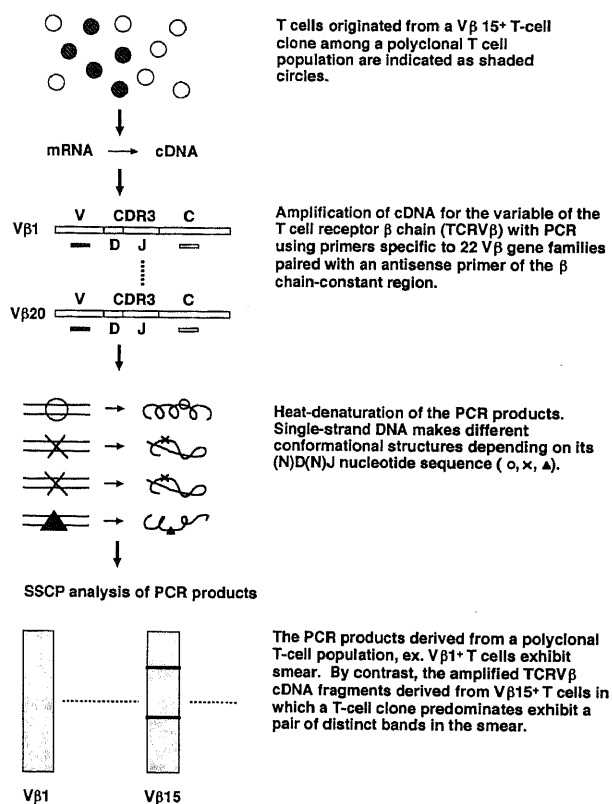


Fig. 2. Analysis of T cell clonotypes by the PCR-SSCP method.

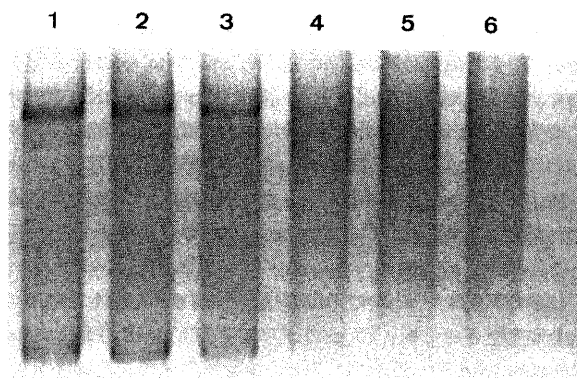


Fig. 3. Sensitivity of the PCR-SSCP method. When RNA extracted from a T cell line with Vβ8.1 (Jurkut) and bone marrow T cells (BM T cells) from a healthy individual were mixed at various ratios (1: 40 to 1: 10240, lanes 2~6), a pair of specific bands of the T cell line was detectable up to a dilution of 1: 640 (lane 4). Lane 1, an amplified Vβ8 cDNA product from the T-cell line Jurkut.

Table 2. Sequence of primers used for PCR

Primer	5'→3' sequence
Vβ 1	GCACAACAGTTCCTGACTTGCAC
Vβ 2	TCATCAACCATGCAAGCCTGACCT
Vβ 3	GTCTCTAGAGAGAAGAAGGAGCGC
Vβ 4	ACATATGAGAGTGGATTTGTCATT
Vβ 5. 1	ATACTTCAGTGAGACACACAGAGAAAC
Vβ 5. 2-3	TTCCCTAACTATAGCTCTGAGCTG
Vβ 6. 1-3	AGGCCTGAGGGATCCGTCTC
Vβ 7	TCCTGAATGCCCCAACAGCTCTC
Vβ 8	ATTTACTTTAACAACAACGTTCCG
Vβ 9	CCTAAATCTCCAGACAAAGCTCAC
Vβ 10	CTCCAAAACTCATCCTGTACCTT
Vβ 11	TCAACAGTCTCCAGAATAAGGACG
Vβ 12	AAAGGAGAAGTCTCAGAT
Vβ 13. 1	CAAGGAGAATCCCCAAT
Vβ 13. 2	GGTGAGGGTACAACATGCC
Vβ 14	GTCTCTCGAAAAGAGAAGAGGAAT
Vβ 15	AGTGTCTCTCGACAGGCACAGGCT
Vβ 16	AAAGAGTCTAAACAGGATGAGTCC
Vβ 17	CAGATAGTAAATGACTTTTCA
Vβ 18	GATGAGTCAGGAATGCCAAAGGAA
Vβ 19	CAATGCCCCAAGAACGCACCCTGC
Vβ 20	AGCTCTGAGGTGCCCCAGAATCTC
3'Cβ	TCCTGATGGCTCAAACAC
The primer for the cloning of Vβ 15 sequences	
Vβ 15	AGTAGATCTCGACAGGCACAGGCT

The size of amplified products (Vβ bands) by Vβ and 3'Cβ primers ranged from about 170 to 220 base pairs. The 3'Cβ primer used in this study matches exactly both Cβ1 and Cβ2. A sequence underlined is an artificial Bgl II restriction site.

クローンがポリクローナルなT細胞集団のなかで優位に増殖していれば、そのT細胞クローンの V β cDNA 断片はスミアの中で一組のバンドとして検出できる (図2)。

V. TCRV β 15cDNA のサブクローニングおよび塩基配列の決定

CyA 依存性の AA の患者 I の骨髄では、TCRV β 15 陽性細胞が単クローン性に増殖していることが SSCP 解析により示唆

されたので、これを確認するため、次の方法を用いた。

5' 側のプライマーとして、V β 15 に特異的なプライマーに制限酵素 BglII (東洋紡, 大阪) 消化部位を付加したものを作成した。表2にこのプライマーの塩基配列を示す。これと C β プライマーを用いて、IV-2, IV-3 に示した条件で患者 I の骨髄T細胞の mRNA より合成した cDNA を PCR で増幅した。増幅産物を 2% アガロースゲルで電気泳動し、適切な分子量の cDNA

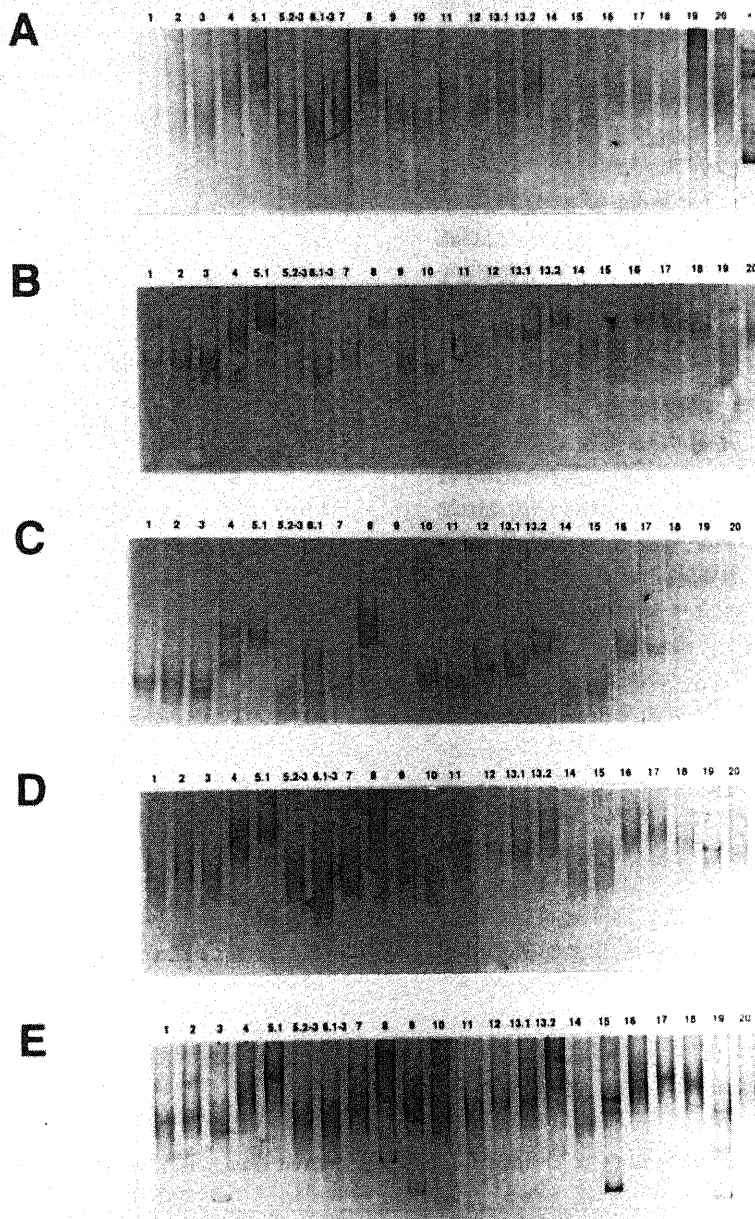


Fig. 4. Clonotype analysis of BM T cells with the PCR-SSCP method. Each lane represents the analysis of T cell clonotypes by the PCR-SSCP method for a particular TCR V β family. When BM T cells from a healthy individual (A) and from an untransfused CyA-responsive patient (Patient 2, B) who achieved a sustained remission off CyA were examined, no distinct bands were detected in any of the 22 TCRV β s. BM T cells from a transfused CyA-dependent patient (Patient 4, C) produced multiple bands with varying patterns in almost all TCRV β s. BM T cells from an untransfused patient (Patient 3, D) who did not respond to CyA showed a pair of distinct bands in the amplified product of V β 19. BM T cells from an untransfused CyA-dependent patient (Patient 1, E) also showed a pair of distinct bands in several lanes corresponding to different V β families. Among these, bands in the amplified product of V β 15 were most distinct. +, an amplified V β 8 cDNA product from the T-cell line Jurcut.

を回収した。1 μ g の cDNA を Klenow fragment (宝酒造, 東京) を用いて平滑末端にした後, BglII (東洋紡) で消化した。ベクター (pBluescriptII, STRATAGENE, Torrey Pines Rd. La Jolla, USA) のマルチクローニングサイトを制限酵素 SmaI (東洋紡) および制限酵素 BamHI (東洋紡) で消化後, cDNA 断片を加えてライゲーションを行った (Takara DNA Ligation Kit Ver. 2, 宝酒造)。JM109 (Competent High E. coli JM109, 東洋紡) を用いて形質転換を行い, 無作為に抽出した形質転換コロニーのうち, 挿入の存在が確認できた20個のコロニーについて CDR3 領域の塩基配列を決定した。塩基配列の決定には, シークエンス反応ロボット (CATALYST, Applied Biosystems Inc., Foster City, USA) と DNA Sequencer 373S (Applied Biosystems) を用いた。塩基配列から予想される CDR3 領域のアミノ酸配列をジーンデータベース (EMBL, Heidelberg, Germany) に登録されているアミノ酸配列と比較した。

VI. 骨髄 T 細胞のクローニング

CyA 依存性の AA の患者 I の T 細胞除去 BMDC より, AIS MicroCELLector (Applied Immune Science, Menlo Park, USA) を用いて CD34⁺細胞を分離した。CD34⁺骨髄細胞を 10%AB 血清加 RPMI 1640 に浮遊させ, 4500rad 照射した自己の CD34⁺細胞とともに 7日間培養した。生細胞を算定後, インターロイキン-2 (rIL-2, シオノギ, 大阪) 100 IU/ml, X線照射した健常人の末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) (5 \times 10⁵/ml) を含む 10%AB 血清加 RPMI 1640 で希釈し, テラサキプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) に 1well あたりの細胞数が0.3個となるように分配した後, 10日間培養した。T細胞の増殖が得られた well から細胞を容量の大きい培養皿に移し, rIL-2 と X線照射した健常人の PBMC を加えた 10%AB 血清加 RPMI を約10日おきに加えることにより T 細胞クローンを得た。T細胞クローンの表面抗原の解析は抗 Leu-4 (CD3) モノクローナル抗体 (monoclonal antibody, mAb), 抗 Leu-3a (CD4) mAb, 抗 Leu-2a (CD8) mAb (Becton Dickinson, California, USA), 抗 beta V5 (a) (V β 5.2 および V β 5.3) mAb, 抗 beta V5 (b) (V β 5.3 の一部) mAb, 抗 V β 5 (c) (V β 5.1) mAb, 抗 beta V6 (a) (V β 6.7) mAb, 抗 beta V8 (a) (V β 8) mAb, 抗 beta V12 (a) (V β 12) mAb (T Cell Diagnostics, Inc., Massachusetts, USA), 抗 TCRBV1S1 (V β 1) mAb, 抗 TCRBV2S1 (V β 2) mAb, 抗 TCRBV3S1 (V β 3), 抗 TCRBV9S1 (V β 9) mAb, 抗 TCRBV11S1 (V β 11) mAb, 抗 TCRBV13S1 (V β 13.1) mAb, 抗 TCRBV13S6 (V β 13.3) mAb, 抗 TCRBV14S1 (V β 14) mAb, 抗 TCRBV16 (V β 16) mAb, 抗 TCRBV17S1 (V β 17) mAb, 抗 TCRBV18S1 (V β 18) mAb, 抗 TCRBV20S1 (V β 20) mAb, 抗 TCRBV21S3

(V β 21.6) mAb (IMMUNOTECH, Marseille Cedex, FRANCE) と FACScan (Becton Dickinson) を用いて行った。一部の IMMUNOTECH 社の TCRV β の名称は, 従来の名称と異なっているが, この論文での TCRV β の名称は, Choi ら²⁰⁾の論文に準じた。TCRV β のどの mAb にも染まらなかった T 細胞クローンについては, N-3 に示した条件で増幅した cDNA 断片を 2%アガロースゲルで電気泳動することにより, V β 15 が陽性

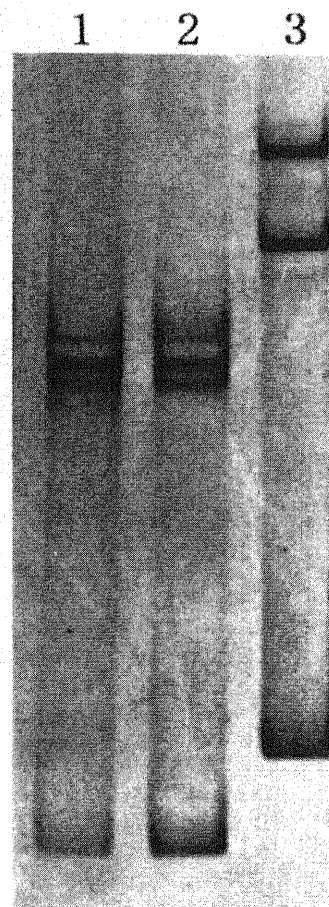


Fig. 5. SSCP analysis for the amplified V β 15 cDNA products from BM T cells of Patient 1 and from a T-cell clone KN15. When the amplified V β 15 cDNA product from a T-cell clone KN15 was analyzed using the SSCP method, the bands from the T-cell clone exhibited the same mobility shift as those of BM T cells. Lane 1, BM T cells; lane 2, KN1; lane 3; an amplified V β 8 cDNA product from the T-cell line Jurcut.

Table 3. Predicted amino acid sequence of cloned PCR products derived from bone marrow T cells and from a T cell clone

Cell	No. of sequences	No. of occurrences	Junctional region		
			V β	(N) D β (N)	J β
BM T cell of Patient 1	20	18	CATS	DLTSGP	NTGEFF (J β 2.2)
		1	CATS	AAGGT	YNEQFF (J β 2.1)
		1	CATS	DASGRI	EQFF (J β 2.1)
T cell clone KN15			CATS	DLTSGP	NTGEFF (J β 2.2)

か否かを決定した。V β 15⁺T細胞クローンについては、Vに示した方法により CDR3 領域の塩基配列を決定した。

成 績

I. 単クローン性に増殖しているT細胞のSSCP法による検出感度

V β 8陽性のT細胞性白血病株 Jurkut から抽出した RNA を、健康人骨髄T細胞より抽出した RNA で 1:40 から 1:10240 となるように希釈した。各希釈系列の RNA から cDNA を合成し、V β 8 に特異的な 5' プライマーを用いて PCR を行った。増幅産物を SSCP 法で解析したところ、図3に示すように Jurkut 由来のクロノタイプに相当する一組のバンドは、Jurkut を 1:640 に希釈したものまで検出が可能であった。したがって、この方法を用いれば、多クローン性のT細胞中に、0.16%以上の単クローン性T細胞が含まれていれば検出が可能と考えられた。

II. AA患者および健康人の骨髄T細胞におけるTCRのクロノタイプ

健康人6例の骨髄T細胞をPCR-SSCP法で解析したところ、22種類のTCRV β cDNAはすべてスメアを呈した。代表的な結果を図4Aに示す。輸血歴のないCyA有効例で寛解維持にCyAを必要としなかった患者IIでも同様にTCRV β はすべてスメアを呈した(図4B)。輸血歴のあるCyA依存例の患者IVでは、V β 3, V β 4, V β 5.1, V β 6.1, V β 8, V β 13.2, V β 15, で薄いバンドが検出された(図4C)。これに対して、輸血歴のないCyA無効例の患者IIIではV β 19の増幅産物中のみ明瞭なバンドがみられた(図4D)。輸血歴のないCyA依存例の患者Iでは、V β 3, V β 8, V β 9, V β 13.2, V β 15, V β 17, V β 19の各増幅産物の泳動レーンにバンドが検出され、なかでもV β 15中のバンドは特に明瞭であった(図4E)。

III. 輸血歴のないCyA依存性のAAの患者Iの骨髄から分離したT細胞クローンのTCRV β

SSCP解析の結果から、患者Iの骨髄中にV β 15⁺のT細胞が単クローン性に増殖していることが示唆されたので、このT細胞クローンの単離を試みた。長期間の培養維持が可能であった12個のT細胞クローンは全てCD4⁺であった。これらのT細胞クローンのTCRV β の発現をmAbで解析したところ、2クローンがV β 13.6⁺、3クローンがV β 14⁺、2クローンがV β 19⁺、5個のクローンは、市販のどのmAbにも反応しなかった。このため、この5個のクローンのTCRV β の発現をPCRで解析したところ、1個がV β 6.1⁺、1個がV β 15⁺、2個がV β 18⁺であった。残り1個のT細胞クローンについては、TCRV β の帰属が決定できなかった。V β 15⁺のT細胞クローン(KN15)のV β 15cDNA増幅産物をSSCP法で解析したところ、KN15のV β 15cDNA断片は、患者の骨髄T細胞のV β 15cDNA増幅産物で認められた明瞭なバンドと全く同じ泳動度を示した(図5)。同様にV β 19⁺の2クローンのV β 19cDNA増幅産物をSSCP法で解析したところ、これらのV β 19cDNA断片の泳動度は、骨髄T細胞全体に対するV β 19cDNA増幅産物で認められたバンドの泳動度とは異なっていた。

IV. TCRV β 15cDNA増幅産物のCDR3領域の塩基配列

患者Iの骨髄T細胞mRNAから合成後、増幅したTCRV β 15cDNAクローンのうち無作為に抽出した20クローン

のCDR3領域の塩基配列を表3に示す。これらのうち、18個のクローンは同一の塩基配列を示した。このCDR3領域の塩基配列は、同じ骨髄から単離したV β 15⁺T細胞クローン(KN15)のCDR3領域の塩基配列と完全に一致していた。

考 察

過去の臨床的観察の結果から、AAはT細胞による造血幹細胞への攻撃によって発症すると考えられている。このような仮説を証明するため、AA患者T細胞の表面抗原やサイトカインの産生能について、数多くの検討が行われてきた。Zoumbosら^{21,22)}は、AA患者では、末梢血や骨髄中にCD8⁺HLA-DR⁺の活性化T細胞が増加していることに加えて、リンパ球からのインターフェロン γ 産生が亢進していることを示した。インターフェロン γ は強力な造血抑制作用を持つことから、彼らは活性化リンパ球から産生されるインターフェロン γ がAAの骨髄抑制の媒介物質であると提唱した。彼らはさらに、AA患者で増加しているCD8⁺HLA-DR⁺リンパ球のTCR遺伝子再構成を検討し、その結果これらの細胞集団は多クローン性であることを示した²³⁾。本研究では、T細胞の単クローン性の増殖を検出するため、サザンブロット法より約30倍感度の高いPCR-SSCP法を用いた。その結果、輸血歴のないCyA依存性のAAの患者Iの骨髄中にV β 3, V β 8, V β 9, V β 13.2, V β 15, V β 17, V β 19などいくつかのT細胞がクローン性の増殖していることが明らかになった。これらのうちV β 15⁺のひとつは、骨髄T細胞を自己のCD34⁺細胞に富む分画と共に培養した後、限界希釈法を用いて分離したT細胞クローンと一致していた。このV β 15⁺T細胞クローンKN15は、AA患者の骨髄中での増加が従来報告されているCD8⁺細胞ではなく、CD4⁺細胞であった²⁴⁾。KN15は、生体内でクローン性に増殖していることから腫瘍性のT細胞の可能性はある。しかし、KN15は同種抗原や植物凝集素(phytohemagglutinin, PHA)に対する試験管内での増殖反応を有しており、細胞の継代にはIL-2の添加が必要であった。また、このV β 15⁺T細胞のクローン性増殖を検出してから三年以上経過しているが、患者IにT細胞系の造血器腫瘍の兆候は全くみられてない。したがって、KN15のクローン性の増殖は腫瘍性の増殖ではなく、何らかの抗原に対応した特異的なものと考えられる。近年、Posnettら²⁵⁾は、健康人であっても高齢者では、CD8⁺T細胞のクローン性の増殖が末梢血に検出されることを見いだした。彼らは、この現象をB細胞系の良性単クローン性ガンマグロブリン血症に相当するT細胞の異常と定義した。今回検討した患者Iは高齢ではあるが、KN15はCD4⁺T細胞であるから、このT細胞の増殖はPosnettらが観察した非特異的なT細胞のクローン性増殖とも異なっている。

本研究で用いたPCR-SSCP法では、 6.4×10^5 個の多クローン性の細胞集団に1000個(0.16%)以上の単クローン性のT細胞集団があれば、そのT細胞のクロノタイプの検出が可能であった。ビオチン標識プローブを用いたDohi²⁶⁾らの方法では、単クローン性T細胞の検出感度の限界は、 6.4×10^6 個の多クローン性細胞集団中1000個(0.016%)とされている。彼ら²⁶⁾は、健康人の末梢血単核球にも単クローン性に増殖するT細胞が検出されたと報告しているが、本研究の健康人骨髄ではこのようなT細胞クローンは検出されなかった。これは両方法の感度の差によると思われる。

輸血歴があるCyA依存性の患者、では、ほとんどすべての

TCRV β cDNA において、単クローン性の増殖を示す複数のバンドが検出された。このような輸血歴のある患者では、輸血製剤による白血球同種抗原刺激が種々のT細胞を増殖させたことが予想される。したがってクローン性に増殖しているT細胞がPCR-SSCP法で、あるAA患者の骨髓中に検出されても、一度でも輸血の既往がある場合には、その意義付けは困難と思われる。

輸血歴のないCyA無効の患者ⅢではV β 19の増幅産物中のみ明瞭なバンドがみられた。この例は、過去の検討で骨髓単核細胞の培養上清中に高濃度のインターフェロン γ が検出されていた(未発表データ)。このため免疫学的な機序の関与が疑われたが、CyAやATGなどの免疫抑制療法は無効であった。このため単クローン性に増殖しているV β 19⁺T細胞の病的意義は不明である。しかし造血の抑制に関与しているが、CyAやATGではその抑制機序が十分に除ききれなかった可能性も考えられる。mAbの投与によってV β 19⁺T細胞のみを排除できれば、このような症例でも改善が得られるかもしれない。

KN15のCDR3領域の塩基配列から予想されるアミノ酸配列を、ジーンデータベース(EMBL)に登録されているアミノ酸配列と比較したところ、全く同じ配列のCDR3領域は見い出せなかった。しかし、多発筋炎の患者の筋肉中に浸潤しているV β 15⁺T細胞のCDR3領域のアミノ酸配列(DL-S)とは酷似していた¹²⁾。多発性筋炎では自己反応性のT細胞が発症に関与していると考えられている。このようなV β 15⁺T細胞の類似性は、AAにおける自己反応性T細胞の関与を示唆していると思われる。

今回の検討により、免疫学的な造血抑制機序の関与が濃厚なAA患者の骨髓中に、何らかの抗原に反応して単クローン性に増殖するCD4⁺T細胞が存在することが明らかになった。輸血歴のないCyA依存性のAAの患者Ⅰから十分な造血前駆細胞を得ることは困難であるため、V β 15⁺CD4⁺T細胞クローンKN15が造血前駆細胞に対してどのような反応を示すかについては検討できなかった。しかし、骨髓で優位に増殖していることから、KN15は造血幹細胞上の抗原を認識することによって直接的に、またはほかの細胞傷害性T細胞を誘導することによって間接的に造血傷害を引き起こしている可能性がある。Sprentら²⁰⁾は、マウスの移植片対宿主病の実験モデルにおいて、少量のドナーのCD4⁺T細胞が、主要組織適合抗原クラスⅡ拘束性にホストの造血幹細胞を直接攻撃し造血障害を引き起こし得ることを証明している。KN15は同様の機序によって、自己の造血幹細胞に対して直接細胞傷害性に働いている可能性も考えられる。このT細胞クローンの機能を検討していくことにより、従来不明であった自己免疫性再生不良性貧血の病態が明らかになると思われる。

結 論

健常人およびCyA投与前のAA患者骨髓T細胞のクローンを解析し、以下の結果を得た。

1. T細胞性白血病株Jurkatより抽出したRNAを健常人骨髓T細胞より抽出したRNAで希釈することにより、PCR-SSCP法による単クローン性T細胞の検出感度を検討したところ、 6.4×10^5 個の多クローン性の細胞集団に1000個(0.16%)以上の単クローン性のT細胞集団があれば、検出可能であった。

2. 健常人6例の骨髓T細胞をPCR-SSCP法で解析したところ、22種類のTCRV β 増幅産物はすべてスメアを呈し、あるT細胞の単クローン性の増殖を示す明らかなバンドは見られなかった。

3. 輸血歴があるCyA依存性のAAの患者Ⅳでは、複数のTCRV β 増幅産物中に多数のバンドが検出された。この例では、輸血に伴う同種抗原刺激によって多数のT細胞がクローン性に増殖したと考えられた。

4. 輸血歴のないCyA依存性のAAの患者ⅠとCyAが無効であった患者Ⅲの骨髓中に、それぞれV β 15⁺とV β 19⁺T細胞の単クローン性増殖が示唆された。患者Ⅰの骨髓から単離したCD4⁺T細胞クローンの一つKN15はV β 15⁺であり、このKN15のV β 15cDNA増幅産物のSSCPゲル上の泳動度は、骨髓で優位に増殖しているT細胞クローンの泳動度と一致していた。

5. 骨髓T細胞由来のV β 15⁺cDNAを増幅・サブクローニング後、CDR3領域の塩基配列を決定したところ、無作為に抽出した20クローン中18クローンがKN15と同一の塩基配列を示した。

6. 免疫学的な抑制機序が発症に関与していると考えられるAA患者の骨髓では、何らかの抗原に反応して単クローン性に増殖するCD4⁺T細胞が存在していることが明らかになった。生体内で優位に増殖しているT細胞クローンの機能や特異性を検討することによって、標的抗原が明らかになることが期待される。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導と御検閲を賜りました恩師松田保教授に深甚なる謝意を捧げます。さらに終始、直接ご指導、ご助言をいただきました金沢大学第三内科講師、中尾真二先生に厚く御礼申し上げますとともに、本研究の遂行に際し多大なご協力をいただきました金沢大学第三内科免疫グループの各位に感謝の意を表します。

なお本研究の要旨は、第56回日本血液学会総会(1994年、新潟)および第36回アメリカ血液学会(1994年、ナッシュビル)において発表した。

文 献

- 1) Frickhofen N, Kaltwasser JP, Schrezenmeier H, Raghavachar A, Vogt HG, Herrmann F, Freund M, Meusers P, Salama A, Heimpal H. Treatment of aplastic anemia with antilymphocyte globulin and methylprednisolone with or without cyclosporine. *N Engl J Med* 324: 1297-1304, 1991
- 2) Gluckman E, Esperou-Bourdeau H, Baruchel A, Boogaerts M, Briere J, Donadio D, Leverger G, Leporrier M, Reiffers J, Janvier M, Michallet M, Stryckmans P. Multicenter randomized study comparing cyclosporine-A alone and antithymocyte globulin with prednisone for treatment of severe aplastic anemia. *Blood* 79: 2540-2546, 1992
- 3) Kawano Y, Nissen C, Gratwohl A, Speck B. Immunostimulatory effects of different antilymphocyte globulin preparations. *Br J Haematol* 68: 115-119, 1988
- 4) Shevach EM. The effects of cyclosporine A on the immune system. *Annu Rev Immunol* 3: 397-423, 1985
- 5) Nakao S, Yamaguchi M, Shiobara S, Yokoi T, Miyawaki T, Taniguchi T, Matsuda T. Interferon- γ gene expression in unstimulated bone marrow mononuclear cells predicts a

good response to cyclosporine therapy in aplastic anemia. *Blood* 79: 2532-2535, 1992

6) Nakao S, Takamatsu H, Chujo T, Ueda M, Shiobara S, Matsuda T, Kaneshige T, Mizoguchi H. Identification of a specific HLA class II haplotype strongly associated with susceptibility to cyclosporine-dependent aplastic anemia. *Blood* 84: 4257-4261, 1994

7) Moss PAH, Rosenberg WMC, Bell JL. The human T cell receptor in health and disease. *Annu Rev Immunol* 10: 71-96, 1992

8) Davies TF, Martin A, Concepcion ES, Graves P, Cohen L, Ben-Nun A. Evidence of limited variability of antigen receptors on intrathyroidal T cells in autoimmune thyroid disease. *N Engl J Med* 325: 238-244, 1991

9) Wucherpfennig KW, Newcombe J, Li H, Keddy C, Cuzner ML, Hafler DA. T cell receptor V α -V β repertoire and cytokine gene expression in active multiple sclerosis lesions. *J Exp Med* 175: 993-1002, 1992

10) Jenkins RN, Nikaein A, Zimmermann A, Meek K, Lipsky PE. T cell receptor V β gene bias in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 92: 2688-2701, 1993

11) DerSimonian H, Sugita M, Glass DN, Maier AL, Weinblatt ME, Reme T, Brenner MB. Clonal V α 12.1⁺ T cell expansion in the peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. *J Exp Med* 177: 1623-1631, 1993

12) Mantegazza R, Andreetta F, Bernasconi P, Baggi F, Oksenberg JR, Simoncini O, Mora M, Cornelio F, Steinman L. Analysis of T cell receptor repertoire of muscle-infiltrating T lymphocytes in polymyositis. *J Clin Invest* 91: 2880-2886, 1993

13) Grom AA, Thompson SD, Luyrink L, Passo M, Choi E, Glass DN. Dominant T-cell-receptor β chain variable region V β 14⁺ clones in juvenile rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11104-11108, 1993

14) Weyand CM, Schönberger J, Oppitz U, Hunder NNH, Hicok KC, Goronzy JJ. Distinct vascular lesions in giant cell arteritis share identical T cell clonotypes. *J Exp Med* 179: 951-960, 1994

15) Li Y, Sun G-R, Tumang JR, Crow MK, Friedman SM. CDR3 sequence motifs shared by oligoclonal rheumatoid arthritis synovial T cells. *J Clin Invest* 94: 2525-2531, 1994

16) Bender A, Ernst N, Iglesias A, Dornmair K, Wekerle H, Hohlferd R. T cell receptor repertoire in polymyositis: Clonal expansion of autoaggressive CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 181: 1863-1868, 1995

17) Jorgensen JL, Esser U, de St. Groth BF, Reay PA, Davis MM. Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics. *Nature* 355: 224-230, 1992

18) Yamamoto K, Sakoda H, Nakajima T, Kato T, Nishioka K. Accumulation of multiple T cell clonotypes in the synovial lesions of patients with rheumatoid arthritis revealed by a novel clonality analysis. *Int Immunol* 4: 1219-1223, 1992

19) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770, 1989

20) Choi Y, Kotzin B, Herron L, Callahan J, Marrck P, Kappler J. Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8941-8945, 1989

21) Zoumbos NC, Gascon P, Djeu JY, Young NS. Interferon is a mediator of hematopoietic suppression in aplastic anemia in vitro and possibly in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 188-192, 1985

22) Zoumbos NC, Gascon P, Trost SR, Young NS. Circulating activated suppressor T lymphocytes in aplastic anemia. *N Engl J Med* 312: 257-265, 1985

23) Young NS. Acquired bone marrow failure syndrome, *In* RI Handin, SE Lux & TP Stossel (eds), *Blood*, p293-365, Lampert, Richard H., J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1995

24) Maciejewski JP, Hibbs JR, Anderson S, Katevas P, Young NS. Bone marrow and peripheral blood lymphocyte phenotype in patients with bone marrow failure. *Exp Hematol* 22: 1102-1110, 1994

25) Posnett DN, Sinha R, Kabak S, Russo C. Clonal populations of T cells in normal elderly humans: The T cell equivalent to "Benign monoclonal gammopathy". *J Exp Med* 179: 609-618, 1994

26) Dohi M, Yamamoto K, Masuko K, Ikeda Y, Matsuzaki G, Sugiyama H, Suko M, Okudaira H, Mizushima Y, Nishioka K, Ito K. Accumulation of multiple T cell clonotypes in lungs of healthy individuals and patients with pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 152: 1983-1988, 1994

27) Sprent J, Surh CD, Agus D, Hurd M, Sutton S, Heath W R. Profound atrophy of the bone marrow reflecting major histocompatibility complex II-restricted destruction of stem cells by CD4⁺ cells. *J Exp Med* 180: 307-317, 1994

Analysis of the T-cell Clonotype in the Bone Marrow of Aplastic Anemia Hideyuki Takamatsu, Department of Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., 105, 673—682 (1996)

Key words aplastic anemia, cyclosporine, T cell receptor, clonotype, single strand conformation polymorphism

Abstract

Immune-mediated suppression of hematopoiesis has been considered to be the most important mechanism responsible for bone marrow (BM) failure in aplastic anemia (AA). In the BM of immune-mediated AA, oligoclonal T-cell proliferation may occur in response to certain antigens. In an attempt to clarify this issue, BM of AA patients was examined for the presence of clonally proliferating T cells. Four AA patients (Patient 1, Patient 2, Patient 3, Patient 4) and six normal volunteers were chosen for this study. Total RNA was extracted from BM T cells of patients and normal subjects, and first strand cDNA was then synthesized. cDNA for T cell receptor (TCR) β genes was amplified by the PCR using primers specific to 22 V β -gene families paired with a β constant region antisense primer. The PCR products were subjected to single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis to detect clonally proliferating T cells among each V β ⁺ T-cell population. When BM T cells from six normal volunteers and from an untransfused CyA-responsive patient (Patient 2), who achieved a sustained remission off CyA, were examined, no distinct bands were detected in any of the 22 TCRV β s. BM T cells from a transfused CyA-dependent patient (Patient 4) produced multiple bands with varying patterns in almost all TCRV β s. In this case, T cell clones expressing various V β segments were thought to be activated by exposure to alloantigens after transfusions. On the other hand, analysis of BM T cells from an untransfused patient (Patient 3) who did not respond to CyA revealed a pair of distinct bands. Analysis of BM T cells from an untransfused CyA-dependent patient (Patient 1) also revealed several distinct bands in the amplified product of T cells expressing limited families of TCRV β , especially in the amplified product of V β 15. To isolate the V β 15⁺ T-cell clone that preferentially proliferated in vivo, BM T cells isolated from BMMC were cultured with irradiated BMMC enriched for CD34⁺ cells, and were subjected to the limiting dilution. One of the CD4⁺ T-cell clones isolated shared a complementarity determining region 3 (CDR3) sequence with the in vivo proliferating T cell clone. These findings indicate that clonal proliferation of CD4⁺ T cells in the BM possibly in response to certain antigen on hematopoietic cells occurs in immune-mediated AA.